

HAPLOİDİ VE BİTKİ ISLAHINDAKİ ÖNEMİ

Nurgül ERCAN¹

Filiz (YILDIRIM) BOYACI¹

Özet: Haploid bitkiler görünüşleri, fizyolojileri bakımından oldukça zayıfturlar ve süs bitkileri olarak kullanımları dışında hiçbir değer taşımazlar. Ancak ıslah amacıyla kullanıldıklarında oldukça büyük öneme sahiptirler. Haploidler tek bir generasyonda yüzde yüz homozigot hatların eldesine imkan vermekte ve oluşan saf hatlar ıslahta değişik amaçlarla kullanılabilirler. Haploidler in vivo da kendiliğinden oluşabilmektedirler. Ancak oluşum frekansının düşük olması ıslahçıları bu konuda çalışmaya yönlendirmiştir. Dolayısıyla günümüzde in vitro da haploid eldesi çalışmaları hız kazanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Haploid, in vitro kültür.

Haploidy And Importance Of Haploid Plants

Abstract: Haploid plants are weak in appearance in agricultural production except ornamental uses. However, when they are used in breeding, they have a great importance. In are generation, homozygout plants can be obtained from haploid plants and these are used in different purposes. Haploids can occur spontaneously in vivo but low frequeneies. For these reasons, plant breeders concentrate their works to obtain haploid palnts in vitro.

Key words: Haploids, In vitro culture.

1. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, ANTALYA

GİRİŞ

Belirli bir tür için karakteristik olan kromozom sayılarında meydana gelen değişimler, genel anlamda 'kromozom sayısı mutasyonları' olarak belirtilirler. Normal kromozom sayısının yarısını taşıyan eşey hücreleri yani gametler ve bireyler de 'haploid' olarak tanımlanırlar.

İslah amacı ile kullanılabilen haploid bitkilerin meydana gelebilmesi için 'bir haploid hücre kaynağının' olması gereklidir. Yüksek bitkilerde haploidi, normal olarak, mayoz bölünme sonucu oluşan sporlarda ve gametlerde görülmektedir (5).

Haploid embriyoların oluşabilmesi için haploid kromozom sayısını içeren gamet hücrelerinin döllenme olmaksızın gelişmesi, ya da zigot oluşumunu izleyen hücre bölünmeleri sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların elemine olması gereklidir. Bazı durumlarda, dişi gametofitin yumurta hücresi dışında başka bir hücresinden (örneğin sinergitlerden) de haploid embriyo gelişebilmektedir (8).

İn vivo da haploidinin kendiliğinden oluşum şeklini 5 grupta toplamak mümkündür.

Gynogenesis

Döllenme olmaksızın yumurta hücresinin zigot gibi bölünmeye başlayarak haploid embriyo oluşturmaya 'gynogenesis' adı verilmektedir. Gynogenesis durumunda; dişi eşey hücresi, erkek eşey hücresi ile birleşmez. Fakat embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen generatif çekirdeği birleşerek haploid embriyonun gelişip çimlenebilmesi için gereksinim duyacağı endospermi oluştururlar (10). Gynogenesis'e özellikle türler arası melezlemelerde örnek olarak Solanum tuberosum ile Solanum phujera gösterilebilir. Tetraploid yapıdaki Solanum tuberosum ile diploid yapıdaki Solanum phujera'nın melezlenmesinden % 3.4-28.6 oranında haploid

embriyo meydana gelebilmektedir. Tetraploid sekonder çekirdekle haploid generatif çekirdek birleşerek:

$$\begin{array}{l} x \text{ generatif çekirdek} \\ 4x \text{ sekonder çekirdek} \quad 6x = 72 \\ x \text{ generatif çekirdek} \end{array}$$

hekzaploid yapıdaki endospermi oluşturur, 2x yapıdaki yumurta hücresinde partenogenetik olarak gelişerek dihaploid (diploid) embriyoyu meydana getirir. Dihaploid patates klonları da Solanum phujera ile melezlenerek haploid patatesler elde edilebilmektedir (5).

Androgenesis

Haploidlerin oluştuğu diğer bir yol ise yumurta hücresinin döllenmesinden önce, dişi eşey hücresinin çekirdeği kaybolur veya inaktif hale geçer. Bu yolla oluşan haploidler, hücrelerinde yalnızca erkek gametin kromozom takımını içerdiklerinden bu olaya androgenesis adı verilmektedir (10). Androgenesis, pratik olarak, F₁ melez döller arasında erkek bireyin özelliklerini taşıyan haploid bitkilerin ortaya çıkması ile anlaşılmaktadır. Örnek olarak Nicotiana cinsine dahil türler arası melezlemelerde androgenetik haploidlere rastlanmaktadır. Nicotiana tabacum var. macrophylla ile Nicotiana langsdorfi'nin melezlenmesinden sadece erkek bireyin özelliklerini gösteren ve haploid yapıda bitkiler elde edilmiştir.

Semigami

İndirgenmiş erkek ve dişi gametler embriyogenesis'e katılmakta ancak çekirdek birleşmesi oluşmamaktadır. Bu olayda yumurta hücresinin nukleusu ve çimlenmiş polen danesinin generatif nukleusu serbestçe bölünür ve bir haploid kimera ile sonuçlanır. Yani erkek ve dişi eşey hücrelerinin birleşerek embriyo oluşumuna katılmasının söz konusu olduğu, fakat çekirdeksel erimenin gerçekleşmediği

semigami durumunda ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler oluşmaktadır. Bu olaya pamuk örnek olarak verilebilir. Gossypium hirsutum ve Gossypium barbadense'nin melezlenmesi sonucu yüksek sıklıkta haploidi bulunmuş olup double haploid hat 57-4 elde edilmiştir (5).

Polyembriyonu

Haploid bitkilerin elde edilebilmesi için baş vurulan diğer yöntem, ikiz bitkiler içinden haploid olanların seçilmesidir. Normal döllenme sonucu zigot bölünmeye başlar. Ancak döllenmiş yumurta hücrelerinin yanındaki sinergit hücrelerinden biri de bölünerek gelişir ve haploid embriyoyu meydana getirir. Yani oluşun tohum içinde biri haploid diğeri iki embriyo bulunur. Bazı diploid-haploid ikizlerin oluşumunda ise erkek gamet sinergiti dölleyerek diploid embriyo gelişirken, yumurta hücresi döllenmediğinden haploid embriyoyu vermektedir (8). Biberde ve kuşkonmazda bu şekilde ikiz embriyolara rastlanmıştır. Müntzing (1961), 16 farklı türden kaynaklanan ve 2.201 ikiz bitkiden oluşan bir koleksiyonu incelemiş ve 6 türe ait 11 haploid bitki bulmuştur. Aynı araştırmacıya göre ikiz yöntemi oldukça iyi sonuç vermekte, fakat ikizlerde haploid oranı % 0.5 ve ikizlerin ortaya çıkma şansı az olduğundan fazla emek istemektedir (11).

Kromozom eliminasyonu

Yumurta hücresi ile polen generatif çekirdeği birleşirler ve döllenme olur. Ancak embriyo gelişiminin ilk safhalarında ebevenlerden birine genellikle babaya ait kromozomlar elemine olur ve gelişen embriyo 'n' sayıda kromozom içerir. Bu şekilde embriyo oluşumuna da 'kromozom eliminasyonu' adı verilmektedir (3). Melezlemeden sonra kromozom eliminasyonu yolu ile haploidlerin elde edilmesine arparlardan bir örnek

verilebilir. Hordeum vulgare ile Hordeum bulbosum türlerinin tetraploid formları arasında melezleme yapıldığında, bazı durumlarda, melez embriyonun ilk gelişme döneminde Hordeum bulbosum'un kromozomları elemine olmakta ve sonuç olarak dihaploid Hordeum vulgare bitkileri elde edilmektedir. Bu iki türün diploid formları arasında melezleme yapıldığında da kromozom eliminasyonu sonucu haploidler elde edilebilmektedir (5).

İn vivoda haploid oluşturma yollarını ise 3 grupta toplamak mümkündür.

1. Kimyasal uygulama

Dişi gametlerin kültüre alınmasıyla haploid bitki eldesinin yanısıra eksik veya yetersiz polenler ile tozlama yoluyla partenogenetik yolla haploid bitki eldesi ve bitkiye dönüştürme çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamış; önce polenlere kimyasal madde uygulamaları ile dölleme yeteneğini yitirme çalışmaları yapılmıştır. MONTELONGO-ESCOBE- DO ve ROWE (1969), ABD'de patateste (Solanum tuberosum L.) in vitro polen mitozu üzerine kolhisinin etkisini incelemek ve kolhisin uygulanmış polenlerle tozlama sonucunda haploid frekansının yükselip yükselmeyeceğini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Merrimack çeşidini ana ebeveyn olarak kullanan araştırmacılar, tozlayıcı olarak yüksek tozlama yeteneğine sahip Solanum phureja ile zayıf tozlama yetenekli Solanum tarijense ve Solanum multidissectum'un polenlerine kolhisin uygulamışlardır. Uygulamalar;

a- %0.02 kolhisine polenlerin 10 dakika süreyle bandırılması ve daha sonra filtre edilerek geri alınması,

b- % 0.01 ve %0.05 kolhisin dozlarında % 10 ve % 20 sakkaroz ile 50 ppm borik asit eklenen çözeltilere polenlerin 20 dakika süreyle bandırılması şeklinde yapılmıştır.

Bütün bu uygulamalardan sonra bu polenlerle yapılan tozlamalarda meyve tutum oranı azalmıştır. Meyve tutumu Solanum phureja ile tozlanan çiçeklerde daha fazla görülmüştür. Elde edilen meyvelerin açımı sonucu alınan tohumlar ekilmişlerdir. Çıkan bitkilerin çoğunluğunun melez özellikte olduğu fakat bunların yanında haploid bitkilerin de mevcut olduğu gözlenmiştir. 100 meyveye düşen haploid bitki sayısı 0.5-4.0 arasındaki değerlerle en fazla Solanum phureja polenlerinin % 0.01 kolhisin + 50 ppm borik asit + % 10-20 sakkaroz çözeltisine bandırılmasıyla (20.8-33.8) elde edilmiştir. Solanum tarijense'den yine aynı uygulamalarda % 7.7-10.8 haploid bitki alınmıştır. Solanum tuberosum bitkilerinin Solanum phureja'nın çiçek tozlarıyla tozlanması sonucunda % 3.9 haploid bitki elde edilmiştir (11).

2. Yüksek dozda X ışınları ile muamele

Yüksek dozda X ışınları ile muamele edilerek inaktif hale getirilmiş polenler kullanılarak haploid embriyolar elde edilebilmektedir. Bu durumda polen generatif çekirdeği yumurta hücrelerini döllenmemektedir, fakat gelişmesi için uyarıcı olmaktadır. Polenler anthesisten bir gün önce toplanarak ışınlanmakta ve bunların dişi çiçeklerle tozlanıp uyartımın sağlanmasıyla haploid bitki elde edilebilmektedir. 1985'te A. Sauton Cucumis melo'da bu yolla haploid bitkiler elde etmiştir. 1988'de C. Dore aynı yolla Brassica oleracea L. capitata'da iki haploid bitki elde etmiştir (3).

3. Başka türün polenleri ile melezleme

In situ haploid uyartım için türler arası melezlemeler en çok kullanılan yöntemlerdendir. Uyartılı ve spontan partenogenesis ile normal olarak döllenme meydana gelmemektedir. Embriyo kesesindeki hücrelerden biri bölünmekte ve haploid bir

embriyonun oluşumuna olanak vermektedir. Bazı türlerde bu embriyo bitkiye dönüştürerek haploid bitkinin oluşumunu sağlamaktadır.

DUMAS DE VAULX (1979), türler arası melezlemeler yaparak kavunu (Cucumis melo) ($2n=24$), Cucumis ficifolius ($2n=4x=48$) ile tozlamıştır. Araştırmacı meyve tutumunu uyartmak için Cucumis ficifolius ile tozlanan kavun çiçeklerini aynı gün veya ertesi gün kavun polenleri ile de tozlamış ve meyve elde etmiştir. Elde edilen meyvelerden alınan tohumlar ekilmiş ve hiç birinden melez bitki elde edilememiştir. Buna karşılık küçük boyutlu bazı fidelerin varlığı dikkati çekmiştir. Yapılan kromozom sayımları sonucu bu bitkiciklerin haploid oldukları anlaşılmıştır. Ayrıca polenlerin çim borusundaki gelişimini uyarmak amacıyla stigma yüzeysel olarak bistüri ile kesilmiştir. Haploidi oranı ilkbahar denemelerinde % 0.284, sonbahar denemelerinde ise % 0.070 olarak bulunmuştur (11).

İN VİTRODA HAPLOİD BİTKİ ELDE ETME YOLLARI

Haploidinin doğal olarak ortaya çıkış frekansının çok düşük olması ve oluşan bireylerinde ıslah çalışmaları için yeterli olmaması konu üzerinde çalışan araştırmacıları bu oranın yükseltilmesi konusunda araştırma yapmaya yöneltmiştir.

Haploidlerin düzenli bir şekilde ve yüksek oranda in vitroda elde edilebilmesi için iki yol görülmektedir:

a- İn vitro dişi veya erkek gametten hareketle ovul-ovaryum ve polen-anter kültürü:

İlk kez Guha ve Maheswari (1964) tarafından (9), Datura innoxia Mill türünde yapay ortamlar üzerinde anter kültürü çalışmaları başlatılmıştır. Günümüzde bu teknik çok sayıda türde (arpa, çeltik, kuşkonmaz, biber, lahana, mısır) başarıyla kullanılmaktadır.

Daha sonra döllenmemiş ovul ve ovaryum kültürleri devreye girmiştir. Bu

yöntem ise arpada, çeltikte ve gerbera'da denenmiştir. Ancak başarı şansı çok düşüktür.

b- İn situ haploid uyartım

Daha önce bahsedilen uyartım yoluyla elde edilen embriyoların, doku kültürüne alınarak embriyo kurtarma teknikleriyle haploid bitki elde edilmektedir (11).

Ovul ve Ovaryum Kültürleri

Dişi gametten haploid bitki elde etme çalışmaları 1950'li yıllarda başlamış ve 1980'li yıllara doğru yoğunlaşmıştır.

1950'li yılların sonunda AALDERS (1958) hıyarda (Cucumis sativus L.) spontan partenogenetik haploid bitki eldesine yönelik çalışmalar yapmıştır. Araştırmacı önce hıyar meyvelerini olgunlaşmamış devrede hasat etmiş ve embriyolarını çıkarmayı denemiştir. Bu yöntemle başarılı olamayan ve embriyo elde edemeyen araştırmacı, daha sonra su üzerinde yüzdürme yolu ile su yüzeyinde kalan hafif tohumlardan embriyo içerenleri ayırmış ve bunları kültüre almış, 13 tane monoploid hıyar bitkisi elde etmiş, böylece de Cucurbitaceae familyasının ilk monoploidlerini bulmuştur. Bütün monoploidler su yüzeyindeki hafif tohumlardan elde edilmiş ve embriyoların 4-6 mm uzunlukta oldukları saptanmıştır. Bu monoploidlerden 8 tanesi büyütülebilmiş ve geliştirilmiş, kolhisinle diploid hale getirilmiş, ancak bu bitkilerden yeni nesiller elde edilememiştir.

SAN NOEUM (1976), Fransa'da arpada (Hordeum vulgare L.) yaptığı çalışmada, döllenmiş yumurtalıkların in vitro kültürü ile ilk kez dişi kökenli haploid bitkiler elde etmeyi başarmıştır. Araştırmacı kültüre aldığı yumurtalıkları 3 grupta sınıflandırmış, aynı çiçekteki çiçek tozlarının tek çekirdekli olduğu aşamayı GI, iki çekirdekli olduğu aşamayı GII, üç çekirdekli olduğu fakat anthesisten önceki aşamayı GIII olarak adlandırmıştır. Değişik boydaki yumurtalıklar kültüre alındığında GI aşamasında olan yumurtalıklar şişkinleşmemiş

veya az şişkinleşmiş, daha sonra da ölmüşlerdir. GII ve GIII aşamasında olan yumurtalıklar ise % 8-12 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde yaklaşık % 0.6 oranında haploid bitkiler vermişlerdir (11).

Anter Kültürü

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan teknik anter kültürü tekniğidir. Özellikle tahıl türlerinde, mikrosporlar totipotent hücreler olduğundan hücre bölünmesi ve farklılaşması bir avantaj sağlamaktadır (4). Bu tekniğin diğer in vitro in vitro haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve uygun bir in vitro sistem ortaya konabildiğinde bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir (6).

Bugün 26 familyadan 60 cinse ait 171 bitki türünde haploid bitkilerin elde dilemesi başarılmıştır. Çin'de yapılan araştırmalarda anter kültürü tekniği kullanılarak 81 çeltik çeşit ve hattı, 20 buğday çeşit ve hattı ve 100 mısır hattı geliştirilmiştir. 1985 yılında Fransa'da Avrupa'nın anter kültürü yoluyla geliştirilmiş ilk buğday çeşidi 'Florin' adı ile tescil edilmiştir.

HAPLOİD BİTKİLERİN ÖZELLİKLERİ

Bilindiği gibi bitkilerin yaşamında iki ayrımlı dönem vardır; gametofitik dönem ve sporofitik dönem. Gametofitik dönem eşey hücreleri safhasıdır. Hücrelerdeki kromozom sayısı yarıya indirgenmiştir. Haploid bitkilerde de durum buna benzemektedir. Ancak haploid bitkiler dış görünüş açısından sporofite benzemektedir. Yani bütün organları mevcut olan tam bitkilerdir. Bununla birlikte dış görünüş bakımından diploidlerden bazı farkları da vardır. Haploid bitkilerde boy daha kısadır. Yapraklar daha küçük ve dardır. Gövde ve dallarda boğum araları kısadır, buna bağlı olarak bitkiler daha kompakt bir habitüs

göstermektedir. Çiçekler daha küçük ve kısırdır. Bitkiler meyve bağlamaz (1). Haploid bitkiler bütün bu özellikleri nedeni ile fizyolojik görünüşleri bakımından oldukça zayıftırlar ve süs bitkisi olarak kullanımları dışında hemen hemen hiçbir tarımsal özellik göstermezler (8).

HAPLOİDLERİN BİTKİ ISLAHÇILARI AÇISINDAN ÖNEMİ

Haploid bitkiler bitki ıslahında aşağıdaki nedenlerle önem taşırlar:

a- Haploid bitkilerde kromozom sayısının spontan olarak veya kimyasal uygulama sonucu ikiye katlanarak kısa sürede homozigot bitkilerin elde edilmesi ıslah sürecini kısaltır. Homozigot bitkilerin elde edilmesi özellikle yabancı döllen bitkilerde önem taşır. Bu tip bitkilerde yabancı döllenme sonucu heterozigotluk artar. Kendine döllenmenin mümkün olduğu yabancı dölenen bitkilerde kendileme ile homozigotluk artırılabilir. Ancak, bu zaman alıcıdır, hemde kendine döllenme sonucu oluşan döllerde kendileme depresyonu ortaya çıkar. Bu nedenle özellikle mısır gibi kültür bitkilerinde hibrid çeşit ıslahında haploid bitki elde edilmesi büyük önem taşır. Diğer taraftan kendine dölenen bitkilerde yapılan melezleme ıslahında arzu edilen genotiplerin seçilebilmesi için arzu edilen karakterler yönünden homozigot hatların elde edilmesi gereklidir. Bu ise 5-7 yılda mümkündür. Bununla birlikte meyve ağaçları ve orman ağaçları gibi generatif döneme erişmeleri çok uzun zaman alan bitkilerde homozigot hatların elde edilmesi daha büyük zaman tasarrufu sağlar.

b- Poliploid bitkilerde çalışıldığında haploid bitkilerin elde edilmesi büyük kolaylık sağlar. Kalıtımın incelenmesi ve arzu edilen karakterlerin kombine edilmesi diploid düzeyde tetraploid düzeye göre çok daha kolaydır.

c- Monohaploid bitkiler mutasyon ıslahında resesif mutasyonların ortaya çıkartılmasında büyük kolaylık sağlar. Örneğin

diploid bir bitkide AA genotipi Aa şeklinde mutasyona uğramışsa bu genotipi AA genotipinden ayırt etmek olanaksızdır. Çünkü dominant A geni resesif a geninin etkisini kapatır. Buna karşılık haploid bir bitki bu genlerden yalnızca birisini taşıyacağından mutasyona uğrayan bitkiler kolaylıkla ortaya çıkabilir. Ayrıca haploid hücrelerde mutasyon oluşturulduğunda kimeraların ortaya çıkması da önlenmiş olur.

d- Haploid bitki elde edilmesinin pratikteki kullanım alanlarından birisi de Asparagus officinalis (kuşkonmaz) bitkisinde süper erkek bitkilerin elde edilmesidir. Çift evcikli bir bitki olan kuşkonmaz bitkisinin dişileri XX, erkekleri ise XY genotipindedir. Döllenme sonucu oluşan bitkilerin yarısı erkek yarısı dişi bitkidir. Erkek bitkiler daha verimlidirler ve dişi bitkilerden önce hasat olgunluğuna erişirler. Eğer erkek bitkilerin anterlerinden haploid bitkiler elde edilirse, bunların yarısı X, yarısı Y genotipinde olacaktır. Y genotipindeki bitkilerde kromozom katlaması yapıldığında YY genotipindeki süper erkek bitkiler oluşur. Daha sonra bu bitkiler vejetatif olarak çoğaltılırlar. Böyle bitkiler dişi bitkileri dölediğinde oluşan yavruların tümü erkek olur.

e- Haploid protoplastlar somatik melezleme için daha uygundur. Çünkü iki haploid protoplastın füzyonu sonucu diploid somatik melez oluşur. Buna karşılık diploid protoplastlar kullanıldığında oluşan somatik melez tetraploid olur (10).

KÜLTÜR SONUCU ELDE EDİLEN BİTKİLERDE PLOİDİ DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

1. Flow Sitometri

Otomatik floresan yönteminin bulunmasından sonra ploidi ölçümleri insan onkolojisinde çok geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Daha sonra bazı bitki bilimciler yöntemi 'flow sitometri' olarak adlandırılmışlar ve pekçok bitki türüne giren çok sayıda

genotipte bitki hücrelerindeki çekirdeksel DNA ölçümlerinde kullanmışlardır.

Araştırmacılar şeker pancarında (*Beta vulgaris*) bu yöntemi uygulamış, 4 mm çapındaki yaprak disklerini alarak tampon çözelti içinde jilette iyice ezmişlerdir. Daha sonra bu hücre içeriğini 40 mm çapındaki naylon filtreden geçirmişler ve DAPI flurochrome tekniği ile DNA histogramlarını çıkarmışlardır.

Brown ve ark. (1991); ploidi analizinde kullanılan farklı teknikleri karşılaştırmışlar ve "flow sitometri"nin en etkili yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Flow sitometri yöntemi karpuz ve kavun türlerinde uygulanmış ve yöntemin bu bitkilerde başarı ile kullanılabileceği belirlenmiştir (11,12).

2. Stoma Hücreleri Uzunluğu

DORE (1986), Bürüksel lahanasında (*Brassica oleracea L. ssp. gemmifera*) haploid, diploid, triploid bireylerde stoma uzunluğu ölçümü yaparak, bu yöntemin klasik kromozom sayımına alternatif olup olamayacağını araştırmıştır. Araştırmacı stoma ölçümü için çok genç ve çok yaşlı yaprakların uygun olmadıklarını belirleyerek, orta yaşlı yaprakların ideal olduğunu saptamıştır. Stoma ölçümleri sonucu brüksel lahanasında haploid bitlerde stoma uzunluğunun yaklaşık 14 µm, diploid bitkilerde 20 µm ve triploid bitkilerde 24 µm'den daha fazla olduğu saptanmıştır. Araştırma sonucunda stoma uzunluğu parametresinin brüksel lahanasında kromozom sayımına alternatif olabileceği vurgulanmıştır.

3. Kloroplast Sayısı

BROWN ve ark. (1991), in vitro gynogenesis yoluyla elde edilmiş olan haploid şeker pancarı bitkilerinin stomalarında kloroplast sayımı yapmışlar ve bunu tanık diploid bitkileri ile karşılaştırmışlardır. Haploid

bitkilerin ($n=x=9$) stomalarında ortalama 9 adet kloroplast sayılırken; diploid bitkilerde ($2n=2x=18$) 16 adet kloroplast bulunmuştur. Araştırmacılar şeker pancarı türünde kloroplast sayısının erken aşamada ploidi düzeyini belirlemede iyi bir kriter olduğunu belirtmektedirler. ROUSEELLE (1992), pancar ve bakla ile *Crusiferae* familyasına giren türlerdeki kloroplast sayımlarında yaprağın alt yüzeyinden bir pensle ayrılan epidermis hücresinin lam üzerine yayılması ve üzerine 1 damla % 1'lik $AgNO_3$ damlatılmasının yeterli olduğunu belirtmiştir (11).

4. Ezme Preparatlarda Kromozom Sayımı

Materyalden alınan kök parçaları fikse edilir. Feulgen metoduna veya aseto karmin yöntemlerine göre boyanan materyal lam üzerine alınıp, üzeri tırnak verniği tabakası ile kapatılır. Metafaz safhası bulunarak kromozom sayımı yapılır (4,12).

HAPLOİDLERİN KROMOZOMLARININ KATLANMASI

Haploid bitkiler steril oldukları için bitki ıslahçıları tarafından önceleri dikkate alınmamıştır. İlk olarak kromozomlarının katlanması sonucu fertiliteye ulaşmak gereklidir. Haploid bitkilerin kromozomlarının ikiye katlanması ya endomitosis ile yani kendi kendine kromozom sayısını iki katına çıkarmasıyla ya da kolhisin uygulamasıyla meydana gelmektedir (9).

ABAK (1993); biberlerde haploid bitkilerden dihaploid bitki elde edilmesi için toprağa şaşırtmadan 20-30 gün sonra kolhisin uygulaması yapılabileceğini belirtmiştir. Araştırmacı, bu aşamada bitkilerin büyüme ucu ile yan dallarının kesilerek kuvvetli bir budamanın yapılmasını ve yaprak koltuklarındaki aksiller tomurcuklar üzerine birer damla % 0.5'lik kolhisin damlatılmasını önermekte ve damlatmanın 24 saat arayla iki kez uygulanmasının yararlı olduğunu

kaydetmektedir (11). Sürmeye başlayan aksiller tomurcukların oluşturduğu sürgünlerin bir bölümü diploid yapıdadır. Haploid sürgünler budanarak bitkinin diploid dallar üzerinde gelişmesi teşvik edilir. Diploid dallar üzerinde meydana gelen çiçekler kendilenererek saf hat niteliğindeki tohumlar elde edilir (1).

MAESTRO-TEJADA (1992); haploid kavun bitkiciklerine in vitro'da 2 saat süreyle % 0.5 kolhisin uygulaması yapmıştır. Kolhisinin toksik etkisini incelemek üzere uygulamayı 1 yaprak ve koltok gözü içeren bireysel mikroçeliklere yada 7-8 boğum taşıyan tün bitkilere yapan araştırmacı; bireysel uygulamada çeliklerin % 31'inin yaşadığını, tüm bitki uygulamalarında ise toksik etkinin daha az olduğunu ve bitkilerin % 65'inin yaşadığını saptamıştır. Araştırmacı kavun türünde genel olarak 2 saat % 0.5 kolhisin uygulama ile bitkiciklerin % 45'inin yaşadığını ve yine bitkilerin % 10'unun katlanarak diploid olduğunu belirtmektedir (11).

DİHAPLOİDLERİN NORMAL DİPLOİD- LERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

DEATON ve ark. (1986); ABD'de Kentucky 16 tütün (*Nicotiana tabacum L.*) çeşidinin normal kendilenmiş bitkileri ile, anter kültüründen gelen ve kolhisinle katlanan dihaploid bitkiler ve ayrıca diploid bitkilerden in vitro hücre kültürleri ile elde edilmiş haploidlerin spontan katlanmasından meydana gelmiş dihaploid bitkileri bazı bitkisel özellikler açısından karşılaştırılmışlardır. Araştırma sonucunda normal kendilemeden gelen diploid bitkiler; dihaploidlere göre daha verimli bulunmuş, daha kısa sürede çiçeklenmeye başlamış, bitki başına daha fazla sayıda ve daha büyük yapraklar oluşturmuş, toplam % alkaloid içerikleri de daha yüksek bulunmuştur.

DORE ve BOULIDARD (1988); beyaz baş lahanada (*Brassica oleracea L. ssp. capitata*) anter kültürü yolu ile elde ettikleri haploid bireyleri kolhisin ile katlayarak

dihaploid bitkiler oluşturmuşlar ve bu bitkileri normal diploid klonu ile karşılaştırmışlardır. Yaptıkları in vitro polen çimlendirme denemesinde dihaploid bitkilerin normal diploid klonuna göre daha zayıf çimlenme yeteneğine sahip olduğu; çiçek tozu boyama testlerinde ise daha cansız çiçek tozlarına sahip olduğu görülmüştür. Baş ağırlığı yönünden dihaploidler hatlara bağlı olarak 6.4-8.6 kg ağırlık yaparlarken, diploid hatta bu değer ortalama 8.6 kg olarak bulunmuştur. Dihaploid bitkilerde yaprak rengi, baş şekli, gövde uzunluğu gibi bitkisel özellikler yönünden hatlar arasında önemli farklılıklar bulunurken; aynı hattaki bitkilerin bu özellik yönünden tamamen homojen oldukları; hatların, kendilenmeleri ile oluşturulan ileri generasyonlarda da bu özelliklerini sürdürdükleri belirlenmiştir (11).

HAPLOİDLERİN BİTKİ İSLAH ÇALIŞMALARINDA KULLANIM ALANLARI

Haploidlerin kendine döllen bitki ıslahındaki en önemli uygulama alanı tek bir generasyonda yüzde yüz homozigot hatların eldesine imkan vermesi esasına dayanmaktadır. Oluşturulan saf hatlar değişik amaçlarla kullanılabilir.

1. Seleksiyon İslahında

Yetiştiriciliği yapılan karışık çeşitler veya populasyonlar kısa sürede saflaştırılabilir. Bu tip materyallerden çekilen haploidlerin katlanmasıyla elde edilen hatlar arazi koşullarında değişik lokasyonlarda denenerek, birkaç yılda ilginç, saf, adaptasyon yeteneği geniş çeşitler geliştirilir.

2. Melezleme Çalışmalarında

Başlangıç melezlemelerinden sonra açılım generasyonlarında homozigotlaştırma için gerekli 6-7 generasyonluk süre, bir generasyona indirilebilmektedir. F₁ veya F₂

generasyonu bitkilerinden çekilen haploidlerin katlanmasıyla oluşturulan hatlarda erken generasyon testleri yapılır ve hemen verim denemelerine geçilebilir. Bu yolla kombinasyon ıslahı süresi 12-13 yıldan 5-6 yıla indirilebilir.

3. F₁ Hibrid Gücü Islahında

Ebeveyn adayı olabilecek materyalin hazırlanma süresi 5-6 generasyondan bir yıla çekilebilmektedir. Kendileme işlemi ortadan kaldırılmakta, katlanmış haploid hatlar doğrudan doğruya genel ve özel kombinasyon yeteneği testlerine alınmaktadır.

4. Mutasyon Islahında

Diploid materyale uygulanan mutagenlerin resesif yönde yarattığı mutasyonlar, böyle materyalden çekilen haploidler yardımıyla ilk generasyonda belirlenebilmektedir.

5. Hastalıklara Dayanıklı Çeşit Islahında

Dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin melezlenmesinden elde edilen bitkilerden anter kültürü ile elde edilen haploidler yine katlanmakta bu hatlardan çok sayıda ırka mukavemeti aynı anda kontrol edilebilmektedir (1).

SONUÇ

Her ne kadar bazı türlerde haploid bitkiler doğada kendiliğinden meydana gelmekteyse de, doğal oluşum oranı çok düşük olduğundan bunların ıslah ve genetik programlarında değerlendirilmesi güçtür. Bütün bu avantajlar göz önüne alındığında haploidi özelliğinin ıslah çalışmalarında kullanılmasına yönelik çalışmaların hızlandırılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. ABAK, K., Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim 1986 İzmir.
2. CHAMBONNET, D., Obtention Of Haploid Plants in Vegetable. Advantages in Breeding Programmes. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Simpozyumu. 1-3 Haziran 1988.
3. DIXON, R. A., Plant Cell Culture. IRL Press Limited P.O. Box 1, Eynsham, Oxford OX8. 133, England, 21-33, 1985.
4. Düzgüneş, O., Ekingen, M. R., Genetik. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın 555, Dres Kitabı 187, Sh 329, 1974.
5. EMİROĞLU, Ü., Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Yardımcı Ders Kitabı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ofset Basım Evi 1982, Bornova, İzmir. 3-17.
6. GÖNÜLŞEN, N., Bitki Doku Kültürleri ve Uygulama Alanları. T. C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 78. Sh: 33. 1987
7. GÜRSÖZ, N., Kavun ve Karpuzda Işınlanmış Polenle Uyarılan In Situ Partenoge-netik Embriyolardan In Vitro Kültürü ile Haploid Bitki Eldesi. Yüksek Lisans Tezi Çukurova Ünivetsitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1990. Sh: 1-12.
8. HERMSEN, G. T., Ramanna, M. S., Haploidy and Plant Breeding. Phill. Trans. R. Soc. Lond. B 292, 499-507 (1981), Printed in Great Britain, 1981.
9. KALLOO, Dr., Vegetable Breeding, Volume III, CRC Press, Inc Boca Raton, Florida, Sh: 136-140, 1986.
10. PIERIK, R. L. M., In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, P. O.Box 163, 3300AD Dordrecht, The Netherlands (243-257), 1989.
11. SARI, N., Karpuzlarda Işınlanmış Polen Uyarımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine

Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1994.Sh: 2-50.

12.ZHONG,D., N., Michaux-Ferriere, M., Coumans, Assay For Doubled Haploid

Sunflower (*Helianthus annuus*) Plant Production by Androgenesis: Fact or Artifact? Part1. In Vitro Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1995.41:91-97.